

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. ⁶ C12N 15/53	(11) 공개번호 특 1998-069057 (43) 공개일자 1998년 10월 26일
(21) 출원번호 특 1997-005929	
(22) 출원일자 1997년 02월 26일	
(71) 출원인 한국과학기술연구원 박원훈 서울특별시 성북구 하월곡동 39-1	
(72) 발명자 최의성 대전광역시 유성구 궁동 395-3 다솔아파트 102-507	
	이상기 서울특별시 광진구 광장동 극동빌라 가동 101호
	이은혜 대전광역시 서구 정립동 우성아파트 112-1305
(74) 대리인 오규환, 이남경	
심사청구 : 있음	
(54) 글루코노박터 서브옥시단스의 솔비톨 탈수소효소 및 이의 유전자	

요약

본 발명은 글루코노박터 서브옥시단스(KCTC 2111) 균주의 원형질막에 존재하는 솔비톨 탈수소효소(sorbitol dehydrogenase) 및 이를 코드하는 유전자에 관한 것이다. 글루코노박터 서브옥시단스로부터 분리, 정제된 솔비톨 탈수소효소는 3 개의 서브유니트로 구성되어 있으며, 피롤로퀴놀린 쿠논(PQQ)을 조효소로 포함하는 75 kDa 분자량의 탈수소효소 서브유니트인 제 1 서브유니트, 50 kDa 분자량의 시토크롬 인 제 2 서브유니트, 그리고 솔비톨 탈수소효소의 안정성에 중요한 역할을 하는 29 kDa 분자량의 제 3 서브유니트로 구성되어 있는 막결합형 솔비톨 탈수소효소이다. 그리고 솔비톨 탈수소효소의 유전자는 2265 bp를 갖는 제 1 서브유니트와 1437 bp를 갖는 제 2 서브유니트를 포함하며, 이를 서브유니트는 제한효소 I으로 절단되는 5.7 kb 크기의 DNA 절편내에 연결되어 있다.

대표도

도 5a

명세서**도면의 간단한 설명**

도 1은 pH 5 및 pH 6의 초산완충액을 이용한 DEAE-TSK 컬럼 크로마토 그래피를 나타낸 것이다.

도 2는 DEAE-TSK 컬럼 크로마토그래피에 의해 분리된 피크 I과 피크 II의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 글루코노박터 서브옥시단스의 솔비톨 탈수소효소 제 1 서브유니트의 아미노 말단을 포함하는 1.53 kb DNA 절편(#SDH 2-1)이 포함된 람다 GEM 5-1의 제한효소 지도를 나타낸 것이다.

도 4는 람다 GEM 5-1을 제한효소 I으로 절단한 5.7 kb DNA 절편에 있어서, 여러 종류의 제한효소로 절단하여 제조한 S1, S2 및 S3 DNA 단편의 위치를 나타낸 것이다.

도 5는 제한효소 I으로 절단한 5.7 kb DNA 절편내의 염기서열을 나타낸 그림이다.

발명의 상세한 설명**발명의 목적****발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술**

본 발명은 글루코노박터 서브옥시단스()의 솔비톨 탈수소효소(sorbitol dehydrogenase) 및 이의 유전자에 관한 것이다.

솔비톨 탈수소효소는 솔비톨을 솔보스로 전환시키는 반응의 촉매로 작용하여, 비타민 C 및 글론산의 전구체로 활용되는 솔보스의 제조와 관련된 효소로 알려져 있다. 솔비톨로부터 솔보스를 제조하는 공정은 글루코노박터 서브옥시단스, 아세토박터 자윌리눔()과 같은 초산균에 의해 수행되며, 통상의 온도에서 24 시간 이내에 96 내지 99%의 전환이 이루어진다(Liebster, J., 50, 395(1956)).

글루코노박터 속에서 발견되는 솔비를 탈수소효소는 그 조효소의 특이성에 따라 NAD-의존성, NADP-의존성 그리고 NAD(P)-비의존성 솔비를 탈수소효소로 분류되며, 이 가운데 직접적으로 산업적인 솔보스 전환에 관여하는 것은 NAD(P)-비의존성 효소인 것으로 알려져 있다(Cummins, J. T. ., 224, 323; 226, 301(1957)).

본 발명자들은 이와 같이 솔비들의 솔보스로의 전환에 관여하는 대표적인 초산균인 글루코노박터 서브옥시단스(KCTC 2111)의 원형질막에 결합되어 있는 막결합형 솔비를 탈수소효소를 정제하여 분석한 결과, 이미 정제 및 효소특성이 알려진 글루코노박터 서브옥시단스 IFO 3254 균주 유래의 FAD 요구성 솔비를 탈수소효소(Shinagawa, E. ., 46, 135(1982))와 조효소 요구성 등이 다른 새로운 솔비를 탈수소효소를 발견하였는데, 이 효소는 피클로퀴놀린 퀴논(PQQ)을 조효소로 포함하며 3 개의 서브유니트로 구성되어 있다(Choi ., 125, 45(1995)).

즉, SYP 배지(솔비를 5%, 박토-펩톤 1%, 효모액기스 0.5%)에서 배양하여 얻은 글루코노박터 서브옥시단스(KCTC 2111) 균체를 10 mM 초산완충액(pH 5.0)에 혼탁, 파쇄하여 얻은 상등액을 초원심분리하여 원형질막 분획을 회수하였다. 1.5% n-옥틸글루코시드(베링거만하임사)를 첨가하여 가용화시킨 원형질막 분획을 CM-TSK 650 (S)(Merck사), DEAE-TSK 650 (S)(Merck사), Mono-S(Pharmacia사) 및 Superose 12(Pharmacia사)와 같은 일련의 컬럼을 이용하여 NAD(P)-비의존성 솔비를 탈수소효소를 정제하였다. 이와 같이 정제된 효소는 솔비를, 만니톨, 리비를 등 여러 풀라울을 각각 100%, 68%, 70% 전환시키는 등 광범위한 기질에 대해 활성을 나타낸다. 특히, 본 효소는 피클로퀴놀린 퀴논 첨가시 활성이 9배 정도 증가하는 등, 조효소로서 피클로퀴놀린 퀴논을 요구하여 형광스펙트럼 결과 정제된 효소가 피클로퀴놀린 퀴논을 조효소로 포함함을 알 수 있었고, 흡광스펙트럼 결과 이 효소는 시토크롬 를 가지는 것을 알 수 있었다. 정제된 효소는 pH 4.3의 산성조건에서 전기영동(Reisfeld, R. A. ., 195, 281(1962))하여 활성영색하면 단일 밴드를 형성하였고, 12.5% SDS-PAGE 상에서 75, 50 및 14 kDa 분자량을 가진 세 서브유니트로 구성되어 있는 것으로 나타났는데, 이를 각각 분자량이 큰 순서대로 제 1 서브유니트, 제 2 서브유니트 및 제 3 서브유니트로 명명하였다(Choi ., 125, 45(1995)).

그러나 좀 더 상세한 실험 결과, 29 kDa 분자량의 또 다른 서브유니트가 솔비를 탈수소효소의 안정성에 매우 중요한 역할을 하는 것을 알게 되었다. 즉, DEAE-TSK 컬럼을 사용한 정제시의 단백질 분리능을 향상시키기 위하여 여러 pH 조건을 조사하던 중, pH 6.0에서 솔비를 탈수소효소 활성을 가지는 피크가 급격히 효소활성을 상실하는 피크와 효소활성을 안정적으로 유지하는 피크의 두 피크로 분리되는 것을 발견하였다. 효소활성이 안정적으로 유지되는 피크는 급격히 효소활성을 상실하는 피크와는 달리 29 kDa 분자량의 서브유니트를 추가로 가지고 있음을 알게 되었으며, 이 서브유니트를 제 3 서브유니트로 재명명하였다. 즉, 14 kDa 분자량의 제 3 서브유니트는 다른 서브유니트와의 상대적 양 등을 감안할 때 진정한 서브유니트인지가 불확실하다.

이하 29 kDa 분자량의 제 3 서브유니트를 가지는 정제효소를 사용하여 솔비를 탈수소효소의 특성을 좀 더 자세히 조사하였다.

솔비를 탈수소효소는 솔비를을 기질로 사용하였을 때의 마카엘리스-멘텐(Michaelis-Menten) 상수는 $K_m=120 \text{ mM}$, $V_{max}=3.9 \times 10^{-5} \text{ M/min}$ 으로 조사되었다. 또한, 솔비를 탈수소효소의 전자수용체로 디클로로페놀 인도페놀(dichlorophenol indophenol: DCIP)이나 페리시아나이드(ferricyanide)가 효과적으로 작용하였고, 전자매개체로서 페나진메소설페이트(phenazine methosulfate: PMS)를 첨가할 경우 그 활성의 증가를 나타내었다. 정제된 효소는 칼슘 또는 마그네슘 이온에 의해 상당한 활성의 증가를 나타내는 반면, 구리 이온은 심한 저해현상을 나타내었다.

그러나, 솔비를 탈수소효소는 원형질막에 결합하여 존재하고 있고, 그 회수율이 0.05% 정도에 불과하므로 이와 같은 추출, 정제에 의해 얻은 효소를 산업적으로 활용하는 데는 어려움이 많다는 문제점이 있다.

따라서, 본 발명자들은 비타민 C 및 글론산의 필수적인 전구체로 활용되는 솔보스의 생산에 필요한 효소인 솔비를 탈수소효소를 대량생산할 수 있는 방법을 연구하던 중, 특히 산업적으로 중요한 원형질막에 존재하는 솔비를 탈수소효소를 글루코노박터 서브옥시단스 균주로부터 분리, 정제하여 그 특성을 규명하여 정제된 효소는 피클로퀴놀린 퀴논(PQQ)을 조효소로 포함하는 75 kDa 분자량의 탈수소효소 서브유니트인 제 1 서브유니트와 시토크롬 인 50 kDa 분자량의 제 2 서브유니트, 그리고 솔비를 탈수소효소의 안정성에 중요한 역할을 하는 29 kDa 분자량의 제 3 서브유니트를 가지는 막결합형 솔비를 탈수소효소임을 알았으며 각 서브유니트의 아미노말단 아미노산 서열을 결정하였다. 그리고 솔비를 탈수소효소의 유전자를 클로닝하여 그 DNA 염기서열을 해독함으로써 제 1 서브유니트와 제 2 서브유니트에 대한 DNA 염기서열을 결정할 수 있게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 글루코노박터 서브옥시단스()의 원형질막에 존재하는 솔비를 탈수소효소 및 이의 유전자를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적에 따라, 본 발명에서는 75 kDa의 제 1 서브유니트(subunit), 50 kDa의 제 2 서브유니트 및 29 kDa의 제 3 서브유니트를 포함하는, 글루코노박터 서브옥시단스()의 막결합형 솔비를 탈수소효소 및 글루코노박터 서브옥시단스(KCTC 2111)의 제한효소 I에 의해 절단되는 5.7 kb 크기의 DNA 절편에 포함되는 솔비를 탈수소효소 유전자를 제공한다.

글루코노박터 서브옥시단스(KCTC 2111)의 원형질막으로부터 일련의 컬럼을 이용하여 솔비를 탈수소효소를 분리 정제한다. 정제된 효소의 여러 생화학적 특성을 규명하고, 각 서브유니트를 순수분리한 후 아미노산 서열 분석기(Applied Biosystems사, 477A)를 이용하여 각 서브유니트의 아미노말단 서열을 결정한다.

결정된 제 1 서브유니트의 아미노말단 아미노산 서열을 토대로 이에 대한 코돈을 활용하여 프라이머 1과 프라이머 2를 합성한다. 글루코노박터 서브옥시단스로부터 추출한 게놈 DNA를 플라스미드 pBluescript SK(Staratagene사)에 연결하고 프라이머 1과 2를 이용하여 SSP-PCR 방법에 따라 30 사이클을 실시하여 1.53kb 크기의 #SDH2-1 조각을 분리한다. 이 조각은 제 1 서브유니트의 아미노말단 일부를 포함한다. 이 #SDH2-1 조각을 플라스미드 pBluescript SK에 연결하고, 이를 이용하여 대장균을 형질전환시킨 후, 형질

전환체를 배양하고 알칼리법으로 플라스미드를 추출한다.

솔비를 탈수소효소의 유전자 라이브러리를 제조하기 위하여, 우선 글루코노박터 서브옥시단스로부터 추출한 개놈 DNA에 제한효소를 처리하여 람다 GEM-11(Promega사)에 클로닝한 다음, 라벨링된 #SDH2-1을 이용하여 상기 라이브러리로부터 람다 GEM 5-1을 분리한다. 이어서, 람다 GEM 5-1을 제한효소로 절단하여 약 5.7 kb 크기의 DNA 절편을 얻어서 DNA 서열을 분석한다. 이 절편을 제한효소 I과 I, 제한효소 I과 II 및 제한효소 I과 I으로 절단하여 각각 S1 DNA 단편, S2 DNA 단편 및 S3 DNA 단편을 제조한다. 수득된 S1, S2 및 S3의 각 DNA 단편들을 ExoIII-멍빈(Mungbean)(Stratagene사)을 이용하여 DNA 염기서열을 해독할 수 있다.

이와 같이 해독된 염기서열을 분석하면, 글루코노박터 서브옥시단스의 솔비를 탈수소효소에는 2265 bp로 구성되어 있고 79,139 Da의 분자량을 갖는 제 1 서브유니트 및 1437 bp로 구성되어 있고 51,368 Da의 분자량을 갖는 제 2 서브유니트가 제한효소 I으로 절단되는 5.7 kb 크기의 DNA 절편내에 연결되어 존재한다는 것을 알 수 있다.

이하, 본 발명을 하기 실시예에 의거하여 좀 더 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이를만으로 제한되는 것은 아니다.

[실시예]

(단계 1) 제 3 서브유니트의 분리 및 기능

글루코노박터 서브옥시단스(KCTC 2111) 균주로부터 솔비를 탈수소효소의 정제과정 중 음이온 교환컬럼인 DEAE-TSK의 pH 변화에 따른 단백질 분리능 및 효소활성도의 안정성에 관하여 조사하였다.

CM-TSK 컬럼을 통해 부분정제된 시료를 pH 5 또는 pH 6의 10 mM 초산완충액을 이용하여 DEAE-TSK 컬럼 크로마토그래피를 수행한 뒤 활성을 나타내는 각 분획의 효소활성을 측정하였다.

도 1에서 보는 바와 같이, pH 6으로 용출한 경우(b)가 pH 5를 사용한 경우(a) 보다 그 분해능이 월씬 더 높았으며, 효소 활성을 보이는 피크 I과 피크 II가 순수하게 분리되었다.

두 피크가 완전히 분리된 pH 6으로 용출한 DEAE-TSK 컬럼 크로마토그래피에 의해 분리된 분획들의 SDS-PAGE 결과는 도 2에 나타내었다. 도 2a는 첫 번째 활성 피크인 피크 I에서 용출된 분획들로서, 제 M 열은 표준분자량 단백질을 나타낸 것이고, 제 1 내지 4 열에서 보듯이, 제 1 서브유니트와 제 2 서브유니트인 75 kDa과 50 kDa 밴드는 관찰되지만 제 3 서브유니트인 29 kDa의 밴드가 나타나지 않았으며, 이 경우에는 용출 후 1 시간 후에는 약 10 배 이상의 효소활성이 감소되는 것을 알 수 있었다. 도 2b는 두 번째 활성 피크인 피크 II에서 용출된 분획들로서, 제 M 열은 표준분자량 단백질을 나타낸 것이고, 제 5 내지 8 열에서 보듯이, 두 서브유니트 외에도 제 3 서브유니트인 29 kDa 밴드가 존재하는 피크 II의 경우에는 효소활성이 그대로 유지되는 것을 확인하였다. 결국, 제 3 서브유니트인 29 kDa 분자량의 단백질은 솔비를 탈수소효소의 작용기작과 밀접한 연관이 있는 전자전달계에 관여할 가능성이 있으며, 솔비를 탈수소효소의 활성도를 안정화시키는 데에 기여하는 것으로 사료된다.

(단계 2) 제 1 서브유니트 및 제 3 서브유니트의 아미노말단 아미노산 서열 결정

글루코노박터 서브옥시단스(KCTC 2111)의 피롤로퀴놀린 퀴논(PQQ)을 조효소로 갖는 솔비를 탈수소효소를 분리 정제하고(Choi, .., 125, 45(1995)), 정제된 효소의 각 서브유니트를 순수분리한 뒤 아미노산 서열 분석기(Applied Biosystems사, 477A)를 이용하여 하기 서열 1의 제 1 서브유니트 및 하기 서열 2의 제 3 서브유니트의 아미노말단 서열을 결정하였다.

[서열 1]

Glu-Asp-Thr-Gly-Thr-Ala-Ile-Thr-Asn-Ala-Asp-Gln-His-Pro-Gly

[서열 2]

Ala-Gly-Thr-Pro-Leu-Lys-Ile-Gly-Val-Thr-Phe-Gln

(단계 3) 프라이머 제작 및 1.53 kb DNA 절편의 분리

결정된 제 1 서브유니트의 아미노말단 아미노산 서열을 토대로 이에 대한 코돈을 활용하여 프라이머 1(5'-CCGGAATTC GAA(G) GAT(C) ACI GGI ACI GC-3') 및 프라이머 2(5'-ATT(C,A) ACI AAT(C) GCI GAT(C) CAA(G) CAT(C) CC-3')를 합성하였다.

탄케다와 시미즈의 방법(Takeda Shimizu, , 72, 1(1991))에 따라 글루코노박터 서브옥시단스로부터 추출한 개놈 DNA를 제한효소 HI으로 부분절단하였다. 이어서 플라스미드 pBluescript SK(Stratagene사)를 I과 HI으로 절단한 후, HI 위치에 부분절단된 개놈 DNA를 연결하였다.

상기 프라이머 1과 프라이머 2, 및 T7 프라이머를 이용하여 SSP-PCR 방법(White, B., SSP-PCR and genome walking, in PCR protocols, Humana Press, 15, 339(1993))에 따라 30 회 실시한 후, 1.53 kb 크기의 절편 #SDH2-1을 분리하였다.

분리된 #SDH2-1 절편을 플라스미드 pBluescript SK에 연결하고 이를 이용하여 대장균 DH5 α 를 형질전환시킨 후, 앰피실린 100 μ g/mL의 첨가된 LB 배지에서 배양하였다. 이어서 알칼리법(Sambrook, J., CSH Press, p.1.25 (1989))으로 플라스미드를 추출하여 이를 프라이머 1 및 프라이머 2와 반응시켰을 때 양성으로 반응하였으며, 이 #SDH2-1 절편은 제 1 서브유니트의 아미노말단 일부를 포함하지만 카르복시말단 부분을 갖고 있지 않았다.

(단계 4) 1.53 kb DNA 절편을 이용한 15 kb DNA 절편의 분리

#SDH2-1을 DIG(베링거만하임사)으로 라벨화하였다(Ausubel, F. Protocols in Mol. Biol., Wiley Sons Inc., p.2.4.1 (1987)).

솔비를 탈수소효소의 유전자 라이브러리를 제조하기 위하여, 상기 (단계 3)과 같은 방법으로 글루코노박터 서브옥시단스(KCTC 2111)로부터 개놈 DNA를 추출하고 이를 제한효소 3A로 부분절단한 15 내지 23 kb 크기의 DNA를 람다 GEM-11(Promega사)의 HI 위치에 클로닝하였다.

상기 라벨링된 #SDH2-1을 이용하여 상기 라이브러리로부터 15 kb 크기의 람다 GEM 5-1을 분리하였다.

도 3은 람다 GEM 5-1의 제한효소 지도를 나타낸 것이다.

(단계 5) 15 kb DNA 절편 중 1 절단부위의 염기서열 해독

람다 GEM 5-1을 제한효소 I으로 절단하여 #SDH2-1을 포함하는 약 5.7 kb 크기의 DNA 절편을 얻었다.

염기서열 해독을 용이하게 하기 위하여, 5.7 kb DNA 절편을 각각 제한효소 I과 I으로 절단한 S1 DNA 단편, 제한효소 I과 II로 절단한 S2 DNA 단편 그리고 제한효소 I과 I으로 절단한 S3 DNA 단편을 제조하였다.

도 4는 람다 GEM 5-1을 제한효소 I으로 절단하여 얻은 #SDH2-1을 포함하는 약 5.7 kb 크기의 DNA 절편에 있어서, 여러 종류의 제한효소로 절단하여 제조한 S1, S2 및 S3 DNA 단편의 위치를 나타낸 것이다.

각 S1, S2 및 S3 DNA의 염기서열을 ExoIII-멍빈(Mungbean)(Stratagene사)을 이용하여 해독하였다.

도 5는 제한효소 I으로 절단한 5.7 kb DNA 절편내의 염기서열을 나타낸 것이다.

여기에서 보듯이, 사인-달가노 서열인 'AGGA'는 651~654 bp에 위치하고, 제 1 서브유니트의 시그널 서열은 665~766 bp에 위치하며, 이 시그널 펩티드가 잘려진 제 1 서브유니트를 코드하는 서열은 767~2926 bp에 존재하였다. 이것은 754 개의 아미노산을 코딩하며, 그 아미노말단 서열이 제 1 서브유니트의 아미노말단 서열분석 결과 밝혀진 15 개의 아미노산 서열과 일치하는 것을 알 수 있었다. 이어서 2950~2953 bp에 사인-달가노 서열(AGGA)이 존재하고, 제 2 서브유니트는 2964~4400 bp에 위치하였으며, 이것은 478 개의 아미노산을 코딩하며, 정지코돈에 이어서 역위 반복서열이 여러개 존재하였다. 또한, 이상의 염기서열로 부터 유추된 활성형 단백질의 분자량은 제 1 서브유니트는 79 kDa, 제 2 서브유니트는 51 kDa으로써, 동효소의 전기영동상 결과인 75 kDa 및 50 kDa 분자량과 유사함을 알 수 있었다.

그리고 세균내에서 발견되는 피를로퀴놀린 퀴논(PQQ)을 조효소로 포함하는 탈수소효소들의 아미노말단과 카르복시말단 부위에서 특징적으로 일치하여 나타나는 서열들이 제 1 서브유니트 내에 존재함을 알 수 있고, 아미노말단 부위에 존재하는 특정적인 일치서열은 하기 서열 3에 나타내었고, 카르복시말단 부위에 존재하는 특정적인 일치서열은 하기 서열 4에 나타내었다. 이는 제 1 서브유니트가 조효소로 피를로퀴놀린 퀴논을 포함하고 있음을 증명하는 또 다른 증거라 할 수 있다(여기에서 Xaa는 임의의 아미노산이다).

[서열 3]

[Asp/Glu/Asn] -Trp-Xaa-Xaa-Xaa-Gly- [Arg/Lys] -Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa- [Phe/Tyr/Trp] -Ser-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa- [Leu/Ile/Val/Met] -Xaa-Xaa-Xaa-Asn-Xaa-Xaa-Xaa-Leu- [Arg/Lys]

[서열 4]

Trp-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Tyr-Asp-Xaa-Xaa-Xaa- [Asp/Asn] - [Leu/Ile/Val/Met/Phe/Tyr] - [Leu/Ile/Val/Met/Phe/Tyr] - [Leu/Ile/Val/Met/Phe/Tyr] - [Leu/Ile/Val/Met/Phe/Tyr] - Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Xaa- [Ser/Thr/Ala] -Pro

이 외에도 하기 서열 5의 헴(heme) 결합서열이 제 1 서브유니트와 제 2 서브유니트 내에 하나 또는 세 개가 존재함을 확인하였다(여기에서 Xaa는 임의의 아미노산이고, Yaa는 Xaa와는 다른 임의의 아미노산이다).

[서열 5]

Cys-Xaa-Yaa-Cys-His

DNA 염기서열의 동일성을 분석한 결과, 제 1 서브유니트의 DNA 염기서열은 피를로퀴놀린 퀴논을 조효소로 포함하는 여러 탈수소효소와 높은 유사성을 보였는데, 특히 아세토박터 플리옥소제네스()와 아세토박터 아세티()의 알코올 탈수소효소와 각각 77%(Tamaki, T. , 1088, 292(1991))와 70%(Inoue, T. , 171, 3115(1989))의 동일성을 보였다. 제 2 서브유니트의 DNA 염기서열은 글루코노박터 서브옥시단스 IFO 12528의 시토크롬 -553(Takeda and Shimizu, , 72, 1(1991))의 서열과 가장 높은 동일성을 나타냈는데, DNA 염기상 동일성은 83%, 아미노산 서열상 동일성은 88%로 나타났다.

이와 같이 제 1 서브유니트와 제 2 서브유니트는 하나의 오페론에 위치함을 확인하였다. 한편 29 kDa를 코드하는 제 3 서브유니트는 아직 발견하지 못하였다.

발명의 효과

이상에서 글루코노박터 서브옥시단스(KCTC 2111)의 솔비를 탈수소효소의 유전자는 2265 bp에 의해 코드되는 제 1 서브유니트, 1437 bp에 의해 코드되는 제 2 서브유니트를 포함하며, 이를 서브유니트는 제한효소 I으로 절단되는 5.7 kb 크기의 DNA 절편내에 연결되어 있음을 알 수 있다. 이를 염기서열은 GenBank에 제 U26263 호로서 1995년 5월 4일에 등록되어 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1. 75 kDa의 제 1 서브유니트(subunit), 50 kDa의 제 2 서브유니트 및 29 kDa의 제 3 서브유니트를 포함하는, 글루코노박터 서브옥시단스()의 막결합형 솔비를 탈수소효소.

청구항 2. 제 1 항에 있어서,

제 1 서브유니트 내에 피를로퀴놀린 퀴논(PQQ)을 조효소로 포함하는 솔비를 탈수소효소.

청구항 3. 제 1 항에 있어서,

제 1 서브유니트가 하기 서열 1의 아미노말단 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 솔비를 탈수소효소.

[서열 1]

Glu-Asp-Thr-Gly-Thr-Ala-Ile-Thr-Asn-Ala-Asp-Gln-His-Pro-Gly

청구항 4. 제 1 항에 있어서,

제 3 서브유니트가 하기 서열 2의 아미노말단 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 솔비를 탈수소효소.

[서열 2]

Ala-Gly-Thr-Pro-Leu-Lys-Ile-Gly-Val-Thr-Phe-Gln

청구항 5. 제 2 항에 있어서,

제 1 서브유니트 내에 피롤로퀴놀린 퀴논(PQQ)을 조효소로 포함하는 솔비톨 탈수소효소의 아미노말단 부위에서 하기 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 솔비톨 탈수소효소(여기에서 Xaa는 임의의 아미노산이다).

[서열 3]

Xaa-Leu- [Arg/Lys]

청구항 6. 제 2 항에 있어서,

제 1 서브유니트 내에 피롤로퀴놀린 퀴논(PQQ)을 조효소로 포함하는 솔비톨 탈수소효소의 카르복시말단 부위에서 하기 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 솔비톨 탈수소효소(여기에서 Xaa는 임의의 아미노산이다).

[서열 4]

Trp-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Tyr-Asp-Xaa-Xaa-Xaa- [Asp/Asn] - [Leu/Ile/Val/Met/Phe/Tyr] - [Leu/Ile/Val/Met/Phe/Tyr] - [Leu/Ile/Val/Met/Phe/Tyr] - [Leu/Ile/Val/Met/Phe/Tyr] - Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Xaa- [Ser/Thr/Ala] - Pro

청구항 7. 제 1 항에 있어서,

제 1 서브유니트 및 제 2 서브유니트가 하기 서열 5의 헴(heme) 결합서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 솔비톨 탈수소효소(여기에서 Xaa는 임의의 아미노산이고, Yaa는 Xaa와는 다른 임의의 아미노산이다).

[서열 5]

Cys-Xaa-Yaa-Cys-His

청구항 8. 글루코노박터 서브옥시단스(KCTC 2111)의 제한효소 I에 의해 절단되는 5.7 kb 크기의 DNA 절편에 포함되는 솔비톨 탈수소효소 유전자.

청구항 9. 제 8 항에 있어서,

솔비톨 탈수소효소 유전자가 2265 bp의 제 1 서브유니트 및 1437 bp의 제 2 서브유니트를 포함하는 솔비톨 탈수소효소 유전자.

청구항 10. 제 9 항에 있어서,

제 1 서브유니트가 하기 서열 6의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 솔비톨 탈수소효소 유전자.

[서열 6]

665 ATGGTTTCTG GTCTACTGAC GCGGATCAAC GTTACGAAGA AGCCCTTCT GGTTGCGCT
 725 GCTGCTCTGG CATTCTGGC CACCTCTCT GTGCCCTGG CTGAGGACAC AGAACAGCC
 785 ATTACAAAGC CCGACCAGCA TCCGGGTGAC TGGATGAGCT ATGCCGGAC CTATTCGAG
 845 CAGCGCTACA GCCCCGTGGA TCAGATCACC AAGGACAATG CGACCAATCT GAAGCTGGCA
 905 TGGCACTACG ATCTGGATAC CAACCGTGGT CAGGAAGGTA CGCCCGTGT CGTTGATGGC
 965 GTCATGTACG CCACCAACAA CTGGAGCAAG ATGAAGGCTC TGATGCAGC TACGGCAAG
 1025 CTGCTGTGGT CTTACGATCC AAAGGTCTCA GGCAACATCG CCGACCGCGG CTGCTCGGAT
 1085 ACGGTCAACC GTGGTGCAGC CTACTGGAAC GGCAAAAGTCT ATTTCCGGCAC CTTGACGGT
 1145 CGCCTGATTG CCCTGGATGC CAAGACCGGC AAGCTGGTCT GGAGCGTCTA TACCGTTCCC
 1205 AAGGAAGGCC AGCTGGTCA CCAGCGCTCC TACACGGTTG ACGGTGCTCC CGGTATCGCC
 1265 AAGGGCAAGG TCATCATCGG CAACGGCGT GGAGAGTTCG GCCCCCGTGG CTTCTGACG
 1325 GCGTATGACG CTGAAACGGG AAAGATGGAC TGGCGCTTCT TCACCGTTCC GAACCGTAC
 1385 AACAAACCGG ACGGGCAGC GTCTGACGAC GTGCTGATGT CCAAGGCTTA TCCGACATGG
 1445 GGCAAGGGCG CGCGTGGAA GCAGCAGGGC GGTGGCGTA CGCTCTGGGA TTCGCTGATC
 1505 TATGACCTCG TAACGGATCT CGTCTATCTG GGCGTCGTA ACCGCTCGCC ATGAAACTAC
 1565 AAGTTCCGTT CTGAAGGAAA AGGCAACAC CTCTTCCCTG GCACCATCGT GGCCATCAAT
 1625 CCTGACACCG GCAAATACGT CTGGCATTT CAGGAAACGC CAATGGACCA GTGGGATTAT
 1685 ACCTCGGTTG ACCAGATCAT GGCCCTCGAC ATGCCCGTCA ATGGCGAAAT GCGCCATGTG
 1745 CTCGTGCATG CGCGAAGAA CGGCTTCTTC TATATCATTC ATGCCAAGAC CGGTAAGTTC
 1805 ATCTCCGGCA AGCGTACAC CTACGAGAAC TGGGCCAATG GCCTCGATCC GGTAAACGGGT
 1865 CGTCCGAACG ACAATCCAGA TGCTCTGG ACGCTGAACG GCAAGCCCTG GTACGGCATC
 1925 CCCGGCGATC TGGGTGGTCA TAACCTGCT GCCATGGCTT ACAGCCCACA GACGAAGCTG
 1985 GTTTACATTG CGGCCAGCA GGTTCCCTTC GTTTACGATC CGCAGAAGGG TGGCTTCAAG
 2045 GTCACCAACG ACACGTTGAA CCTTGGCTC GACATGAACA AGATCGGCTT GCTTGATGAC
 2105 AACGATCCAC AGCACAAAGC TGACAAGGCC CAGTTCTGAA AGGATCTGAA GGGCTGGATC
 2165 GTTGCATGGG ATCCCGAGAA GCAGCAGGGC GCCTTCACGG TTGACCACAA GGGTCCGTGG
 2225 AATGGCCGTC TTCTGGCAAC GGCTGGTGGC GTTCTGTTCC AGGGTCTCGC CAACGGTGG
 2285 TTCCACCGCT ACCGACCGGAC GACGGTAAG GATCTCTCA CCTTCCCAGC ACAGACGGCC
 2345 ATCATTGCC CGCCAGTCAC CTACACAGCC AACGGCAAGC AGTATGTTGC GTTGAAGTGC
 2405 GGCTGGGGCG GTATCTATCC GTTCTCTG GCAGGGCTAG CCCGTACGTC CGCTGGACC
 2465 GTCAACCACT CCCGATCAT CGCGTCCGCT CTGGACCGCA ACCACAAGCT GCCAGCCAAG
 2525 AACGAGCTCG GCTTCGTTCC AGTGAAGGCC CCTGAGAAAT CGGATGAAGC CAAGATCAAG
 2585 GACGGCTACT TCCAGTTCCA GACCTATTGC GCAGCTGCC ATGGTGACAA CGGTATCTCC
 2645 GGCGGTGTTG TGCCAGACCT GCGCTGGTCC GGTGCCATCC GTGGAGAGGA GAAGTTCTAC
 2705 AAGCTCGTCG GCAAGGGTGC TCTAACGGCC TACGGTATGG ACCGTTTCA CACGTCCATG
 2765 TCGCCAGCTG AAATCGAAGA CATCCCAAC TTCCCTGTGA AGCGCGCAA CGAGTCCTAC
 2825 GCAGACGAAG TCAAGGCCCC AAAGAATGAG GCAGGGCTCC CTAACGGCGA ATTCCCTAAC
 2885 GTCCCTCAGG GTTCGGTTGC GCCTGCAACG CGGGACCATC CGTAA

청구항 11. 제 9 항에 있어서,

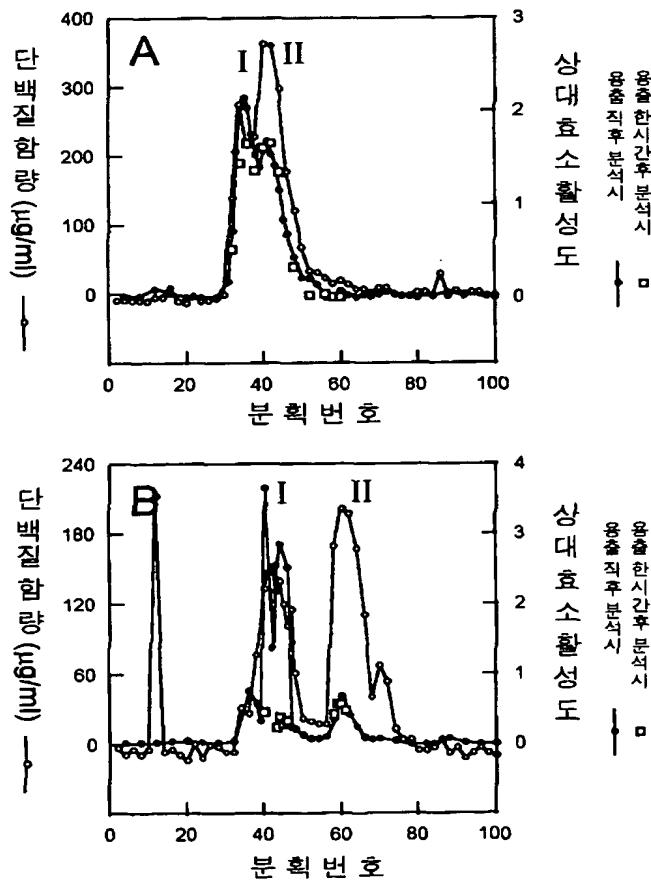
제 2 서브유니트가 하기 서열 7을 포함하는 것을 특징으로 하는 솔비를 탈수소효소 유전자.

[서열 7]

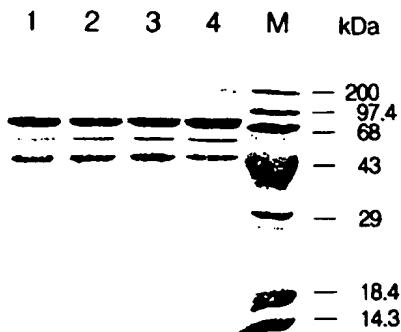
2964 ATGCTCAAGG CATTAACTCG GGACAGACTG GTATCTGAGA TGAAACACGGG ATGCAAATAC
 3024 GCGGCCGCGAG TCGGCCTCAT GGCACTGCTCT TTGGTGTGCTG CCCAAGGCCA GGACGCTGAT
 3084 GACGCCCTGA TTCAAGCGGG TCCCTACGTG GCGGCCCTGT CTGACTGGGT TGCTGCCAT
 3144 ACCGCACTAC ACGGCCAGCC TTTTGCTGGT GGTCTGGAGA TCAAGAGCCC GATCGGCACG
 3204 ATCTACTCCA CCAACATCAC GCCTGACCCG AAATACGGTA TCGGCAACTA TACACTCGAA
 3264 GATTCACGA AGGGCATCCC TAAGGGTATC CGCAAGGACG GCGGCACGGT TTATCCGGCC
 3324 ATGCCGTATC CTGAGTTGCG TCGCCTGTCT GATGACGACA TCAAGGCCAT GTATGCCCTC
 3384 TTCAATGCATG GCGTGAAGCC GGTGCGCCTT CAGAACAAAGC AGCCGGACAT CTCCCTGGCG
 3444 ATGAAACATGC GCTGGCCGTT GGCCATCTGG CGCGCGATGT TTGTTCCGAC TGTACACCCA
 3504 GCGCTCGACA AGAGCCATCTC CGATCCGAA GTGGCCGCTG GCGAATACCT CCTGAATGGC
 3564 CCAGGCCATT GTGGCGAGTG TCATACCCCC CGTGGCATGG CCATGCAGGT CAAGGGCTAT
 3624 ACGGCCAAGG ACGGCAACGC TTACCTCTCC GGTGGCGCAC CGATCGACAA CTGGATTGCT
 3684 CCCAGCCTGC TAGGAATAG CGACACGGGT CTGGTTCGCT GGTCTGAAGA CGACATTGCC
 3744 GAGTTCCCTGA AGAGCGGCCG TATGACCAT TCTGCCGTCT TCGGTGGCAT GCGTACGTG
 3804 GTGGCCTACA GCACCCAGCA CTGGACCCG GACGATCTGC ACGCAACGGC CAAGTACCTG
 3864 AAGAGCATGC CGGCGTTCC GGAAGGAAA AACCTGGGTC AGGATGACGG CAAGGCCACG
 3924 GCCCTGCTCG AAGCCGGTGG CAAGGGTGT GCAGGGCGAG AGGTTTACCT CCACAACCTG
 3984 GCCATCTGCC ATATGAACGA TGGCACTGGT GTCAACCCGCA TGTTCGGCC GCTGGCTGGC
 4044 AACCCGGTCG TCATCACCGA CAATGCAACC TCAATGGCCA ACATCGTGAC ATTGGCGGT
 4104 ATTCTGCCTC CGACGAATAC GGCGCCATCT GCTGTTGCCA TGCCGGGCTT CGCGATCAT
 4164 CTGTCCTGACC AGCAGATCGC CGATGTTGTG AACTTCATGC GCAAGAGCTG GGGCAACCG
 4224 GCTCCGGAA CCCTGCTGTC CTGGATATC CGCAAGCTCC GCACATCGGG TACTGCGGTT
 4284 TCCACGGCG GCTGGAACGT CTCTTCAAG GGCTGGATGG CCTACATGCC GCAGCCTTAT
 4344 GCGGAAGGCT GGACCTTCTC CCCGCAGACA CACACGGGG TGGATCAGGC TCAGTAA

도면

도면 1



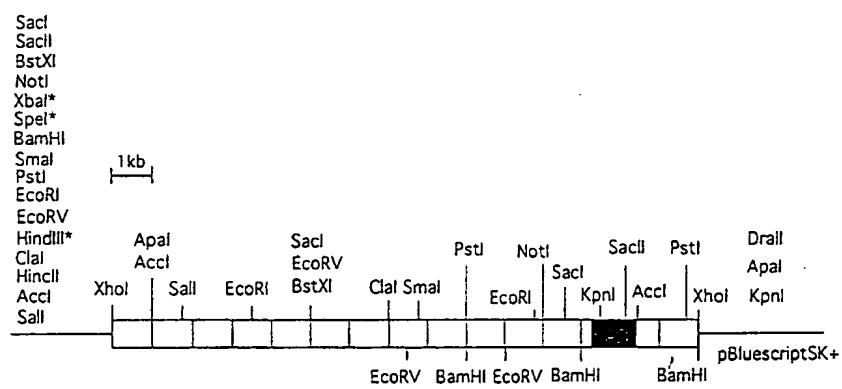
도면2a



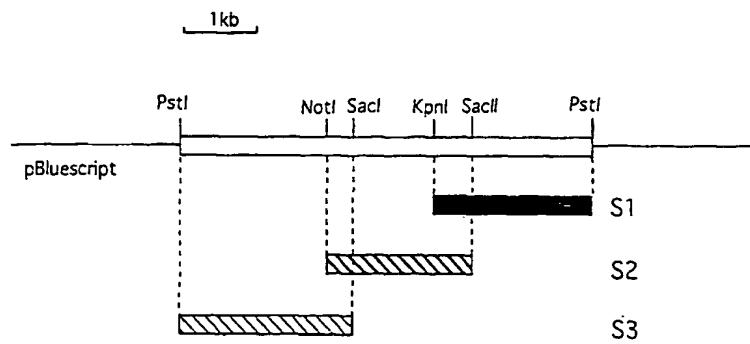
도면2b



도면3



도면4



도면5a

10 20 30 40 50 60
 CGAGAACCGA AGCCCGCTGA AATCGACCG TTCCCCATCA AAATACTTTT CGAGAACGATC
 70 80 90 100 110 120
 ACGAACCTTC ACCAGGAGCG GCGTCTCTTC CTGATCGCGC CCCCCACCCCCC AATCGAGAGC
 130 140 150 160 170 180
 AACAAATACGC CCGTCATCTT CACTGATGGT CAGGGCTCCG AGATGGGAAT GGCAGGAAAG
 190 200 210 220 230 240
 CTGTGGCATA CAGATACGCT GCCCCATCCC CCGGAAAGCG TCAATCATGC TTCCCTAAAA
 250 260 270 280 290 300
 GAGTCCCTGA GAAAAAAATA CATGCGTGTGTC ACGCATATGC AGGGAGGCCG GTATTCTCAA
 310 320 330 340 350 360
 ATAACATATG GGATCAITTT TGTATGATT CATGAAATAT TACGCACITTT GTTGAGAAAC
 370 380 390 400 410 420
 TGCCATTITTT TGTGTCAAC CTGCGACAGA CACTAAAGCT GTTTGGTTG TTTGGITATT
 430 440 450 460 470 480
 AAGAATAATT CTCAITGAAT TAAGCGAGCG ATTTACGCG GATACTGCTC ACGGAGACGT
 490 500 510 520 530 540
 CAGAACCCCA CGTTTCCGAC AAACAATAAA ATAAGCGAGT AGTAAGTTCA CGCGATGCTA
 550 560 570 580 590 600
 CGTTTTCCAG ACGACTTGGGA GAAACTGAGG AGCACCTAGG CACCCACAGA GGCAGCTATC
 610 620 630 640 650 660
 AGGACTTGGGA TTACGTCTGA ATACCATTAA CAGGAACAGT CTTTGCAAAA AGGACAGTCG
 670 680 690 700 710 720
 GATCATGGTT TCTGGTCTAC TGACGCCGAT CAACGTTACG AAGAAGCGCC TTCTGGTTG
 730 740 750 760 770 780
 CGCTGCTGCT CTGGCATTCT GCGCCACCTC TCCTGTCGCC CTGGCTGAGG ACACAGGAAC
 790 800 810 820 830 840
 AGCCATTACA AACGCCGACC AGCATCCGGG TGACTGGATG AGCTATGGCC GGACCTATTG
 850 860 870 880 890 900
 CGAGCAGGCC TACAGCCGCA TGGATCAGAT CACCAAGGAC AATCGAGCA ATCTGAAGCT
 910 920 930 940 950 960
 GGCATGGCAC TACGATCTGG ATACCAACCG TGGTCAGGAA GGTACGCCGC TGATCGTTGA

도면5b

970	980	990	1000	1010	1020
TGGCGTCATG	TACGCCACCA	CAAACCTGGAG	CAAGATGAAG	GCTCTGGATG	CAGCTACGGG
1030	1040	1050	1060	1070	1080
CAAGCTGCTG	TGGTCTTACG	ATCCAAAGGT	TCCAGGCAAC	ATCGCCGACC	GCGGCTGCTG
1090	1100	1110	1120	1130	1140
CGATACGGTC	AACCGTGGTG	CAGCCTACTG	GAACGGCAAA	GTCTAITTCG	GCACCCITCGA
1150	1160	1170	1180	1190	1200
CGGTCCCTCG	ATTGCCCTGG	ATGCCAAGAC	CGGCAAGCTG	GTCTGGAGCG	TCTATAACGGT
1210	1220	1230	1240	1250	1260
TCCCAAGGAA	GCGCAGCTGG	GTCACCAGCG	CTCCTACACG	GTGACGGTG	CTCCCCGTAT
1270	1280	1290	1300	1310	1320
CGCCAAGGGC	AAGGTATCA	TCGGCAACGG	CGGTGAGAG	TTGGCGCCC	GTGGCTTCGT
1330	1340	1350	1360	1370	1380
GACGGCTAT	GACGCTGAAA	CGGGAAAGAT	GGACTGGCGC	TTCTTCACCG	TTCCGAACCC
1390	1400	1410	1420	1430	1440
TGACAAACAA	CCGGACGGCG	CAGCGCTCTGA	CGACGTGCTG	ATGTCCAAGG	CTTATCCGAC
1450	1460	1470	1480	1490	1500
ATGGGGCAAG	GGCGGCGCGT	GGAAAGCAGCA	GGGGGGTGGC	GGTACCGTCT	GGGATTGCGCT
1510	1520	1530	1540	1550	1560
GATCTATGAC	CCTGTAACGG	ATCTCGTCTA	TCTGGCGTC	GGTAACGGCT	CGCCATGGAA
1570	1580	1590	1600	1610	1620
CTACAAGTTC	CGTTCTGAAG	AAAAAGGCAA	CAACCTCTTC	CTCGGCAGCA	TCGTGGCCAT
1630	1640	1650	1660	1670	1680
CAATCCTGAC	ACCGGCAAAT	ACGTCTGGCA	TTTCAGGAA	ACGCCAATGG	ACCAAGTGGGA
1690	1700	1710	1720	1730	1740
TTATACCTCG	GTTCAGCAGA	TCATGGCCCT	CGACATGCCG	GTCAATGGCG	AAATGCGCCA
1750	1760	1770	1780	1790	1800
TGTGCTCGTG	CATGCGCCGA	AGAACGGCTT	CTTCTATATC	ATTGATGCCA	AGACCGGTAA
1810	1820	1830	1840	1850	1860
GTTCATCTCC	GGCAAGCCGT	ACACCTACGA	GAACGGGCC	AATGGCCTCG	ATCCGGTAAC
1870	1880	1890	1900	1910	1920
GGGTCGTCCG	AACTACAATC	CAGATGCTCT	CTGGACGCTG	AACGGCAAGC	CCTGGTACGG

도면5c

1930	1940	1950	1960	1970	1980
CATCCCCGGC	GATCTGGGTG	GTCATAACTT	CGCTGCCATG	GCTTACAGCC	CACAGACGAA
1990	2000	2010	2020	2030	2040
GCTGGTTTAC	ATTCCCGCCC	AGCAGGTTC	CTTCGTTAC	GATCCGCAGA	AGGGTGGCTT
2050	2060	2070	2080	2090	2100
CAAGGCTCAC	CACGACAGCT	GGAACCTTGG	CCTCGACATG	AAACAGATCG	GCCTGCTTGA
2110	2120	2130	2140	2150	2160
TGACAAACGAT	CCACAGCACA	AGGCTGACAA	GGCCCAGTTC	CTGAAGGGATC	TGAAGGGCTG
2170	2180	2190	2200	2210	2220
GATCGTTGCA	TGGGATCCGC	AGAACGCAGCA	GGCAGCCTTC	ACGGTTGACC	ACAAGGGTCC
2230	2240	2250	2260	2270	2280
GTGGAATGGC	GGTCTTCTGG	CAACGGCTGG	TGGCGTTCTG	TTCCAGGGTC	TCGCCAACGG
2290	2300	2310	2320	2330	2340
TGAGTTCCAC	GCCTACGAGC	CGACGACGGG	TAAGGATCTC	TTCACCTTCC	CAGCACAGAG
2350	2360	2370	2380	2390	2400
CGCCATCAIT	GCCCCGCCAG	TCACCTACAC	AGCCAACGGC	AAGCAGTAIG	TTGCGGTG
2410	2420	2430	2440	2450	2460
AGTGGGCTGG	GGCGGTATCT	ATCCGTCTT	CCTGGGCCGC	GTAGCCCCTA	CGTCCGGCTG
2470	2480	2490	2500	2510	2520
GACCGTCAAC	CACTCCCGGA	TCATCGCGTT	CGCTCTGGAC	GGCAACGACA	AGCTGCCAGC
2530	2540	2550	2560	2570	2580
CAAGAACGAG	CTCGGTTTCG	TTCCAGTGAA	GCCGCCCTGAG	AAATGGGATG	AAGCCAAGAT
2590	2600	2610	2620	2630	2640
CAAGGACGGC	TACTTCCAGT	TCCAGACCTA	TTGCCAGGCC	TGCCATGGTG	ACAACGGTAT
2650	2660	2670	2680	2690	2700
CTCCGGCGGT	GTTCCTGCCAG	ACCTGCGCTG	GTCCGGTGC	ATCCGTGGAG	AGGAGAAAGTT
2710	2720	2730	2740	2750	2760
CTACAAGCTC	GTGGCAAGG	GTGCTCTAAC	GGCCTACGGT	ATGGACCGTT	TCGACACGTC
2770	2780	2790	2800	2810	2820
CATGTCGCCA	GCTGAAATCG	AAGACATCCG	CAACTTCCTT	GTGAAGCGCG	CCAACGAGTC
2830	2840	2850	2860	2870	2880
CTACGCAGAC	GAAGTCAAGG	CCCGAAAGAA	TGAGGCAGGC	GTCCCTAACG	GCGAATTCCCT

도면5d

2890	2900	2910	2920	2930	2940
CAACGTCCT	CAGGGTCGG	TTGCGCTGC	AACGCCGAC	CATCCGTAAC	GGGAAACCGT
2950	2960	2970	2980	2990	3000
CACGCTGAAA	GGAATGACGT	GACATGCTCA	AGGCATTAAC	TOGGGACAGA	CTGGTATCTG
3010	3020	3030	3040	3050	3060
AGATGAAACA	GGGATGGAAA	TACGCGGCCG	CAGTCGGCCT	CATGGCAGTG	TCTTCGGTG
3070	3080	3090	3100	3110	3120
CTGCCCCAACG	CCAGGACGCT	GATGACGCC	TGATTTCAGCG	CGGTGCTTAC	GTGGCCCGCC
3130	3140	3150	3160	3170	3180
TGTCTGACTG	CGTTGCTGC	CATACCGCAC	TACACGGCCA	GCCTTTTGCT	GGTGGTCTGG
3190	3200	3210	3220	3230	3240
AGATCAAGAG	CCCGATCGGC	ACGATCTACT	CCACCAACAT	CACGCCCTGAC	CCGAAATAACG
3250	3260	3270	3280	3290	3300
GTATCGGCAA	CTATACACTC	GAAGATTICA	CGAAGGGAT	CCGTAAGGGT	ATCCGCAAGG
3310	3320	3330	3340	3350	3360
ACGGCGCGAC	GGTTTATCCG	GCCATGCCGT	ATCCCTAGTT	CGCTCGCTG	TCTGATGACG
3370	3380	3390	3400	3410	3420
ACATCAAGGC	CATGTATGCC	TTCCTCATGC	ATGGCGTGAA	GCCGGTCGCC	CTTCAGAACAA
3430	3440	3450	3460	3470	3480
AGCAGCCGGA	CATCTCCCTGG	CCGATGAACA	TGCGCTGGCC	GTGGCCATC	TGGCGCGCGA
3490	3500	3510	3520	3530	3540
TGTTTGTTC	GAATGTCAACA	CCAGGCCCTCG	ACAAGAGCAT	CTCCGATCCG	GAAGTGGCGC
3550	3560	3570	3580	3590	3600
GTGGCGAATA	CCTCGTGAAT	GGCCCAGGCC	ATTGTGGCGA	GTGTCAATCG	CCCCGTGGCA
3610	3620	3630	3640	3650	3660
TGGCCATGCA	GGTCAAGGCC	TATACGGCCA	AGGACGGCAA	CGCTTACCTC	TCCGGTGGCG
3670	3680	3690	3700	3710	3720
CACCGATCGA	CAACTGGATT	GCTCCCAGCC	TGCGTAGCAA	TAGCGACACG	GGTCTGGGTC
3730	3740	3750	3760	3770	3780
GCTGGTCTGA	AGACGACATT	GCCGAGTCC	TGAAGAGCGG	CCGTATCGAC	CATTCTGCCG
3790	3800	3810	3820	3830	3840
TCTTCGGTGG	CATGGCTGAC	GTGGTGGCCT	ACAGCACCCA	GCACTGGACC	GACGACGATC

도면5e

3850	3860	3870	3880	3890	3900
TGCACGCAAC	GGCCAAGTAC	CTGAAGAGCA	TGCCGGCCGT	TCCGGAAGGC	AAAAACCTGG
3910	3920	3930	3940	3950	3960
GTCAGGATGA	CGGCAAGGCC	ACGGCCCTGC	TCGAAGCCGG	TGGCAAGGGT	GATGCAGGCG
3970	3980	3990	4000	4010	4020
CAGAGGTITA	CCTCCACAAAC	TGTGCCATCT	GCCATATGAA	CGATGGCACT	GGTGTCAACC
4030	4040	4050	4060	4070	4080
GCATGTTCCC	GCCGCTGGCT	GGCAACCCGG	TCGTCATCAC	GGACAAATGCA	ACCTCAATGG
4090	4100	4110	4120	4130	4140
CCAACATCGT	GACATTGGC	GGTATTCTGC	CTCCGACGAA	TACGGCGCCA	TCTGCTGTTG
4150	4160	4170	4180	4190	4200
CCATGCCGGG	CTTCGGCGAT	CATCTGCTG	ACCACAGAT	CGCCGATGTT	GTGAACATTCA
4210	4220	4230	4240	4250	4260
TGCGCAAGAG	CTGGGGCAAC	CAGGCTCCGG	GAACCCCTGTC	TGCTCTGGAT	ATCCGCAAGC
4270	4280	4290	4300	4310	4320
TCCGCACATC	GGGTACTGCG	GTTTCCACGG	CCGGCTGGAA	CGTCTCTTCC	AAGGGCTGGA
4330	4340	4350	4360	4370	4380
TGGCCTACAT	GCCGCAGCCT	TATGGCGAAG	GCTGGACCTT	CTCCCCGAG	ACACACACGG
4390	4400	4410	4420	4430	4440
GCGTGGATCA	GGCTCAGTAA	GCCTCTCCAG	ACCCCTGTCAG	TCTGACAGAA	AAGGGCGGTC
4450	4460	4470	4480	4490	4500
CGGATACGGG	CCGCCTTTTT	CTTTTGATT	CAGGCCGTTT	TCACAGGATG	GCATCCTGCA
4510	4520	4530	4540	4550	4560
CTACATATGA	AGGCATGACT	CCCTTCTCGT	CTTCTGCTCC	GCAGTCAGTT	TTCCCTTTGG
4570	4580	4590	4600	4610	4620
CAACAGGCC	AGGCCGGCA	GCATTGCCAT	CATGCGCGCC	AGGACCCGGA	AGCGCCGAGC
4630	4640	4650	4660	4670	4680
TTCTCAAGAG	CCTCTGCGGT	TCCCCTCCTG	ACCCCTGACG	CGCCACCTGC	GCAGCTGCGC
4690	4700	4710	4720	4730	4740
CATCAAGGCG	AAAGTGTGGA	TCATGCCGTG	GTTCTCTGGC	TTCTGTGACC	GAAATCCTAC
4750	4760	4770	4780	4790	4800
ACCGGCGAAG	ACGGGTGTCG	AACTCCACCT	TCATGCTGGA	CCCGCTGTAA	TCACTCGCGT
4810	4820	4830	4840	4850	4860
TGCCTGATGCT	CTGACCGATC	TGGGTGCGACG